

**Title**

Fermentative production of L-threonine

**Inventor Name**

Nakayama, Kiyoshi; Kobata, Mamoru; Tanaka, Yoshitake; Nomura, Tadaaki

**Patent Assignee**

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan

**Publication Source**

Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 3 pp.

**Identifier-CODEN**

JKXXAF

**Patent Information**

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 50025790	A2	19750318	JP 1973-80275	19730718 <--
JP 55042630	B4	19801031		

**Priority Application Information**

JP 1973-80275	19730718
---------------	----------

**Abstract**

L-threonine (I) was produced by *Protaminobacter candidus* or *Methanomonas methylovora*. Thus, *P. candidus* ATCC 21372 was cultured on a medium (pH 7.2) contg. MeOH 20 ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10, urea 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, and CaCO<sub>3</sub> 20 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10, MnSO<sub>4</sub>·4-5H<sub>2</sub>O 8, thiamine-HCl 1, and phenol red 10 mg, and biotin 10 .mu.g in 1 l. at 30° for 67 hr. MeOH was added at 1% after 16 hr and at 2% each after 24 and 40 hr cultivation; the pH was adjusted with 2N NH<sub>4</sub>OH. Prodn. of I was 50 mg/l. To 3 l. culture broth, 60 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O was added with stirring. The resulting ppt., CaCO<sub>3</sub>, and cells were removed by centrifugation. The supernatant was concd. under reduced pressure and the resulting ppt. was removed thus yielding 55 ml supernatant. I in the supernatant was adsorbed on Diaion SK 1 (H+) at pH 2, eluted with 0.25N NH<sub>4</sub>OH, and crystd. with addn. of EtOH yielding 65 mg crystals.

**International Patent Classification**

C12D

**Document Type**

Patent

**Language**

Japanese

**Accession Number**

1975:477000 CAPLUS

**Document Number**

83:77000

Our Ref. OP1631-US

Prior Art Reference

Japanese Patent Laid-Open Publication No. Sho 50-25790

Laid-Open Date: March 18, 1975

Patent Application No. Sho 48-80275

Filing Date: July 18, 1973

Title: PROCESS OF PRODUCING L-THREONIN BY A FERMENTATION METHOD

Inventors: Kiyoshi NAKAYAMA, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken, Japan,

Mamoru KOBATA, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken, Japan,

Yoshitake TANAKA, Machida-shi, Tokyo, Japan, and

Tadaaki NOMURA, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO KABUSHIKI KAISHA

(English: Kyowa Fermentation Co., Ltd.)

Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

- - - - -

Translation of Claim (only one claim):

A process of producing L-threonin comprising the steps of:

culturing a strain, which belongs to the *genus Protaminobacter* or the *genus Methanomonas* and having an ability to produce L-threonin, in a medium containing a carbon source, a nitrogen source, inorganics and other nutrient elements which can be assimilated by said strain;

isolating L-threonin from the culture; and

collecting the isolated L-threonin.



(2000円)

特 許 願

昭和48年7月18日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称

発酵法によるL-スレオニンの製造法

2. 発明者

住 所 神奈川県横浜市南区大田町1丁目6番9号  
氏 名 中山 博 (ほか2名)

3. 特許出願人

郵便番号 100  
住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号  
名 称 (102)協和醗酵工業株式会社  
代表者 高 田 弘

4. 添付書類の目録

(1) 明 細 書 1通 方式審査  
(2) 願書副本 1通

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法によるL-スレオニンの製造法

2. 特許請求の範囲

プロタミノバクテリウム属またはメタノモナス属に属するL-スレオニン生産性菌株を、該菌株の炭化しうる炭素源、窒素源、無機物およびその他の栄養源を含有する培地に培養し、培養物からL-スレオニンを単離、採取することからなるL-スレオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

L-スレオニンは、人間や動物にとって栄養上必須のアミノ酸の一つであり、医薬、食品、飼料などに広く利用されている重要な物質である。

従来、微生物を利用するL-スレオニンの製法としては、グルコースなどの糖質を原料とする方法(特公昭38-14375号公報)、ソルビトルやマルトールを原料とする方法(米

① 日本国特許庁

公開特許公報

① 特開昭 50-25790

③ 公開日 昭50.(1975) 3. 18

② 特願昭 48-80275

② 出願日 昭48.(1973) 7. 18

審査請求 未請求 (全3頁)

庁内整理番号

7110 49

⑤ 日本分類

364D251

⑥ Int.Cl<sup>3</sup>

C12D 13/06

BEST AVAILABLE COPY

国特許第2937/21、同2937/22)、炭化水素を原料とする方法(米国特許第3232358、同3684653)、エタノールを利用する方法(特公昭47-29号公報)、アクロモバクテリウムおよびシュードモナス属に属し、メタノール炭化性を有する菌株を利用するメタノールからL-スレオニンを製造する方法(特公昭45-25273号公報)などが知られている。

しかしながら、前記特公昭45-25273号公報によれば、メタノールからのL-スレオニンの生成量は、1/1~2/100程度であり、満足すべきものではない。

本発明者らは、アクロモバクテリウムおよびシュードモナス属以外の菌株についてメタノールからのL-スレオニンの生産について検索した結果、たとえば、プロタミノバクテリウム・カンディダス(Proteaminobacter candidus)、ATCC21372およびメタノモナス・メチロボラ(Methanomonas methylovora)

ATCC 21367 の培養物中に L-スレオニンが生成する事を見出した。

このようなプロタミノバクター属およびメタノモナス属の菌株による L-スレオニンの生成については従来未知のものであり、本発明が最初のものである。

以下本発明の方法について説明する。

菌株としては、プロタミノバクター属およびメタノモナス属に属し、L-スレオニンを生成する能力を有するものを使用する。

その具体例としては、プロタミノバクター・カンディダス ATCC 21372 およびメタノモナス・メタロバクター ATCC 21367 があげられ、これらの菌株については、その菌学的性質が米国特許 3,663,370 に記載され既知である。

菌株の培養のための培地としては、使用する菌株の増殖する炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源をほとんど含有するものを利用する。

たとえば、プロタミノバクター・カンディダ

スもしくはその消化物などの窒素性有機物質など種々のものが使用可能である。

さらに無機物として磷酸第一カリウム、磷酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸カルシウムなどを使用する。

また、本発明に使用する微生物が生育のために特定の栄養素を必要とする場合はその栄養素を適量培地に存在せしめなければならないが、この種の栄養素は前記の窒素性有機物質に含まれて加えられる場合があり、その様な時には特に添加する必要はない。

培養は振盪あるいは底部通気攪拌などの好気的条件下で行う。培養温度は通常 20~40℃ の範囲で、培地の pH は 5~7 の範囲に、好ましくは中性付近に保持することが望ましいが、これ以外の温度条件あるいは pH 条件下でも菌が生育すれば実施可能である。培地の pH 調整は硫酸カルシウム、pH 緩衝剤、あるいは酸またはアルカリ溶液を添加することにより目的を達

特開 昭50-25790(2)

ス ATCC 21372 およびメタノモナス・メタロバクター ATCC 21367 を利用する場合は、炭素源としてメタノールを使用する。

その他の菌株を使用する場合は、該菌株の炭素源の増殖性をチェックしてそれぞれに適したものを選択して使用する。

メタノールを炭素源として使用する場合、培養初期から高濃度を使用すると微生物の生育を阻害することがあるので、通常は 0.5~3% の低濃度で培養を開始し、その後、必要に応じて少量 (0.5~3%) ずつ逐次添加することが好結果を生じる。

培地の窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、磷酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、またはアンモニア、尿素、アミン類その他の窒素含有化合物、ならびにペプトン、ヒスチン、肉エキス、コーンステアーリカー、カゼイン加水分解物、卵加水分解物、フィッシュミールもしくはその消化物、脱脂大

豆もしくはその消化物などの窒素性有機物質など種々のものが使用可能である。

上記の方法に従って 1~3 日間培養を行うと培養液中に L-スレオニンが生成蓄積する。

培養終了後、菌体および硫酸カルシウムなどの沈殿物を除去し、実施例にも示す様なイオン交換樹脂処理によつて培養液より L-スレオニンを採取する。その他公知のイオン交換樹脂処理法、濃縮法、吸着法、沈澱法などを併用することによつても L-スレオニンを回収することができる。

以下、本発明の実施例を示す。

実施例 1

菌株としてプロタミノバクター・カンディダス ATCC 21372 を使用した。

この菌株を種培養培地 (メタノール 20 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 5 mg, サイアミン塩酸塩 1 mg, ビオチン 10 mg を水に溶解して 1 l とした (pH

7.3))で30℃、24時間振盪培養し、この培養液1mlを発酵培地(メタノール20ml、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  80g/10g、尿素1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  8mg、サイアミン塩酸塩1mg、ビオチン10μg、炭酸カルシウム20g、フェノールレッド(pH指示薬)10mgを水に溶解して1lとした培地(pH7.3))10mlを含む250ml容三角フラスコに接種して、30℃で振盪培養を行なつた。この際メタノールを培養開始14時間後に1g、24時間、40時間後にそれぞれ3g(合計5g)添加し、かつ培地のpHを2規定アンモニア溶液で中性付近に調節した。かくして培養67時間後の培養液中のL-スレオニンの生成量は50mg/lであつた。

培養終了後、培養液3lに塩化カルシウム・2水塩の粉末60gを攪拌しながら徐々に加え、生成した沈殿物、炭酸カルシウムおよび菌体を漉し上げて除き、減圧下で乾燥して生成した沈殿

特開 昭50-25790(3)  
を再び漉し上げて除き、上清液53mlを得た。この上清液のpHを3に調節した後、強酸性イオン交換樹脂ダイヤイオンBK-1( $\text{H}^+$ 型)(三菱化成社製)のカラムに通してL-スレオニンを吸着させ、0.2規定アンモニア水で溶出してL-スレオニンを含む画分を集め、濃縮後、エタノールを添加しながら晶出させ、L-スレオニンの結晶を得た。収量65mg。

#### 実施例2

種菌としてメタノモナス・メチロボラ ATCC 21369を使用する他は実施例1の場合と同様に培養したところ培養液中のL-スレオニン生成量は25mg/lであつた。

特許出願人 (102) 協和発酵工業株式会社  
代表者 高 田 弘

#### 1 前記以外の発明者

住所 神奈川県川崎市多摩区王禅寺262番地  
氏名 木 橋 守  
東京都町田市金井町西の台団地  
3-9-308  
田 中 芳 武  
東京都世田谷区大原3-3-6  
野 村 忠 亮